

福井大学重点研究 「競争的配分経費」

FILIP 相同分子の機能解析による神経系発生の解析

研究代表者：八木 秀司（医学部医学科、講師）

電話：0776-61-8305、メールアドレス：yagi@fukui-u.ac.jp

概 要	
	<p>FILIP 分子は当教室で同定した分子であり、その機能は Filamin の分解を促進することで、細胞移動を抑制していることを報告してきた。この FILIP 分子には 2 つの相同遺伝子があり、FILIP 分子の機能を補う可能性が考えられた。今回、細胞増殖や細胞移動に関わることが報告された FILIP 相同分子が FILIP-Filamin の分子機構に関わる可能性を検討した。FILIP 相同分子と結合する分子として、Filamin 分子、キネシンファミリー分子、heat shock protein を同定した。さらに、これらの分子と FILIP 相同分子の結合は、培養細胞中の FILIP 相同分子の発現状態に応じて変化することを見いだした。これらの分子のうち、Filamin および heat shock protein は FILIP 分子とも結合する。FILIP 相同分子と FILIP 分子の機能は、Filamin と heat shock protein との結合により調節されていると考えられた。</p>
関連キーワード	細胞骨格、FILIP、Filamin、heat shock protein、キネシン

研究の背景

神経細胞の発生過程では、神経上皮で生まれた神経細胞が、軟膜側に移動し、分化していく。この細胞移動に関わる分子として FILIP 分子および Filamin に注目し、当教室では研究を行ってきた。FILIP 分子の解析を行っていく過程で、FILIP 分子の機能を欠損させた場合に予想される結果とは異なることが判明した。この理由の一つとして FILIP 分子の機能を修飾するような分子が存在する可能性があると考えた。その候補分子として FILIP 分子と相同性の高い分子が FILIP 分子の機能を補っている可能性を考えた。

homology search の結果では、FILIP 分子に相同性の高い 2 つの相同分子が存在することが判明した。この相同分子の一つは、最近、HUVEC 細胞で細胞増殖および細胞移動を抑制し、アポトーシスを引き起こす分子として報告された。また、endostatin により HUVEC 細胞内に発現が誘導された FILIP 相同分子は細胞膜近傍から細胞質内に顆粒状の集合体を形成することが報告された。この報告より、この FILIP 相同分子が FILIP 分子の機能の一部を修飾している可能性を考えた。

研究の目的

当教室では FILIP 分子が神経細胞の移動に関わる事を明らかにしてきた。FILIP 分子は葉状仮足形成に重要な機能を果たしている Filamin の Calpain による分解を促進している。FILIP 分子の強制発現により細胞内に存在する Filamin の総量が減少し、細胞移動に支障をきたすことを明らかにしてきた (*Nat Cell Biol* 4,495)。しかしながら、生体内では、FILIP 分子の欠損による異常は予想される結果とは異なっており、何らかの分子が FILIP 分子の欠損を補っている可能性が考えられた。

FILIP 分子には 2 種類の相同分子が存在する。研究対象の FILIP 相同分子は細胞増殖との関係で注目されているが、細胞内での局在、報告された機能より、FILIP 分子の機能との関連性が強く疑われた。この FILIP 相同分子の機能を解明し、さらには FILIP 分子もしくは Filamin 分子との関連性を明らかにすることを目的として、FILIP 相同分子の結合分子を検索し、その FILIP 相同分子の細胞内局在に関し検討を行った。

研究の成果

1) FILIP 相同分子の細胞内分布の変化と Filamin との関係

蛍光蛋白質 GFP を FILIP 相同分子に結合し、その分子の動態を観察できる強制発現ベクターを構築した。このベクターを培養細胞 COS-7 細胞内に発現し、その動態を観察した。その結果、蛋白発現ベクターを導入した後、発現早期では細胞膜近傍および細胞骨格に一致した分布を示す傾向にあり、時間経過とともに細胞内でドット状の分布を示すことが判明した。この結果は、HUVEC 細胞で報告された内在性の FILIP 相同分子の局在と一致した。また、発現早期に認めた細胞膜近傍および細胞骨格上の FILIP 相同分子は、アクチン線維、および、Filamin の局在と一致した。

この FILIP 相同分子の細胞内分布の変化に対して、Filamin との結合状態が変化しているか免疫沈降法を用いて検討した。培養細胞内に FILIP 相同分子を強制発現し、1 日後、および 2 日後に免疫沈降法を用い、Filamin との相互作用を検討した。1 日後では、FILIP 相同分子は Filamin と結合していたが、2 日後では Filamin との結合を認めなかった。FILIP 相同分子は細胞膜近傍もしくはアクチン線維上の Filamin と局在した後、何らかの修飾により細胞内に局在を変化させている可能性が考えられた。

2) FILIP 相同分子と結合する分子の検索

先に認めた細胞内での分布の変化が FILIP 相同分子の機能を調整している可能性を考えた。結合する分子としてキネシファミリー分子の一つが FILIP 相同分子に存在する PEST ドメインを欠損した分子に結合することを昨年度報告した。この分子と全長の FILIP 相同分子との結合は強制発現後 1 日目では弱く、発現 2 日目には強くなる傾向を認めた。さらに、FILIP 相同分子との結合を認める分子として heat shock protein の一つを同定したが、この分子は強制発現ベクター導入後、1

日後では結合を認めたが、2 日後では結合を認めなかった。この 2 つの分子との結合の変化が FILIP 相同分子の細胞内分布に関わる可能性があると考えられた。そこで、キネシファミリーと強く結合した FILIP 相同分子変異分子の細胞内局在を調べたところ、核周囲に大きなドットを形成する傾向が強いことが判明し、さらにこの PEST ドメインを欠損した分子は heat shock protein と結合しないことが判明した。

この結果は、FILIP 相同分子は生体内で、heat shock protein により局在が制御されている可能性を示唆している。

以上の結果より、FILIP 相同分子と Filamin、heat shock protein、およびキネシファミリー遺伝子の相互作用が存在することが明らかとなった。FILIP 分子は Filamin と結合するが、FILIP 相同分子と結合する heat shock protein とも結合する。このことは、この heat shock protein を介し、FILIP 分子および FILIP 相同分子の機能が発揮されている可能性を示唆していると考えられた。

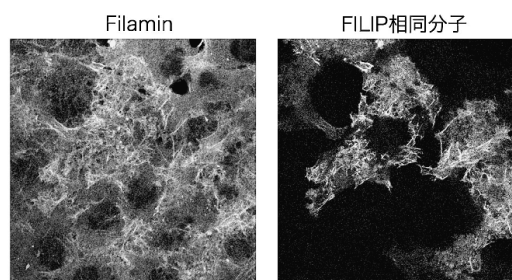


図 1. FILIP 相同分子の発現パターン（早期）

COS-7 細胞に蛍光蛋白質タグした FILIP 相同分子を強制発現し、24 時間後に固定した後、抗 Filamin 抗体を用いて Filamin の分布を可視化した。二つの分子の局在は一致する部位が認められる。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究に関しまして、本教室の佐藤真教授、および、謝先生、猪口先生、また、他の教室の皆様の様々なご指導、御協力をいただきました。この場をお借りいたしまして、お礼申し上げます。

「本研究に関わる発表論文」

Ando, K., Yagi, H., Suda, Y., Aizawa, S., Sakashita, M., Nagano, T., Terashima, T. and Sato, M. ; Establishment of framework of the

cortical area is influenced by Otx1, *Neurosci Res.* 60(4):457-459. 2008.

Hisahara, M., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohara, S., Sato, M., and Horio, Y. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 105(40): 15599-15604. 2008.